

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

1652

In re PATENT APPLICATION of
Inventor(s): DUSCH et al.

Appln. No.: 09 | 456,306
Series ↑ | ↑ Serial No.
Code



Group Art Unit: 1611

Filed: December 8, 1999 Examiner: Unknown

Title: Novel Nucleotide Sequences . . .
Atty. Dkt. PM 265182 | 990159BT
M# | Client Ref

Date: June 23, 2000

**SUBMISSION OF PRIORITY
DOCUMENT IN ACCORDANCE
WITH THE REQUIREMENTS OF RULE 55**

Hon. Asst Commissioner of Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Please accept the enclosed certified copy(ies) of the respective foreign application(s) listed below for which benefit under 35 U.S.C. 119/365 has been previously claimed in the subject application and if not is hereby claimed.

Application No.

Country of Origin

Filed

199 51 975.7

Germany

October 28, 1999

RECEIVED

JUN 27 2000

TELE FAX CENTER 1600/2900

Respectfully submitted,

Pillsbury Madison & Sutro LLP
Intellectual Property Group

1100 New York Avenue, NW
Ninth Floor
Washington, DC 20005-3918
Tel: (202) 861-3000
Atty/Sec: ASH/maf

By Atty: Ann S. Hobbs Reg. No. 36830

Sig: C. S. Hobbs Fax: (202) 822-0944
Tel: (202) 861-3063

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Bescheinigung

Die Degussa-Hüls Aktiengesellschaft in Frankfurt am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Neue für das poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen"

am 28. Oktober 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 07 K , C 12 N und C 12 P der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 10. April 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

im Auftrag

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Patentzeichen: 199 51 975.7



AC

Neue für das poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen

Gegenstand der Erfindung sind für das poxB-Gen kodierende Nukleotidsequenzen aus coryneformen Bakterien und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren,
5 insbesondere L-Lysin durch Abschwächung des poxB-Gens.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere Lysin finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der
10 Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der
15 Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch
20 z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die *intrinsischen* Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst
betreffen. *JUN 27 2001*

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion
25 und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der
30 rekombinannten DNA-Technik zur Stammverbesserung von L-Aminosäure produzierenden Stämmen von *Corynebacterium* eingesetzt.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von Aminosäuren insbesondere L-Lysin bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

L-Aminosäuren, insbesondere Lysin finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der

5 Tierernährung Anwendung. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran, neue verbesserte Verfahren zur Herstellung von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der

10 Gruppe

a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,

b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% 15 identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,

c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und

20 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei es sich bevorzugt um eine 25 replizierbare DNA handelt, enthaltend:

(i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1, oder

(ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des 30 genetischen Codes entspricht, oder

- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutralen Sinnmutationen in (i).

5 Weitere Gegenstände sind

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleotidsequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt,

ein Polynukleotid gemäß Anspruch 2, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz, wie in SEQ ID No. 2 dargestellt, enthält

10 ein Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, Punkt d insbesondere pCR2.1poxBint, hinterlegt in E.coli DSM 13114

15 und als Wirtszelle dienende coryneformen Bakterien, die in dem pox-Gen eine Insertion oder Deletion enthalten.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso Polynukleotide, die im wesentlichen aus einer Polynukleotidsequenz bestehen, die erhältlich sind durch Screening mittels Hybridisierung einer entsprechenden Genbank, die das vollständige Gen mit

20 der Polynukleotidsequenz entsprechend SEQ ID No. 1 enthalten mit einer Sonde, die die Sequenz des genannten Polynukleotids gemäß SEQ ID No. 1 oder ein Fragment davon enthält und Isolierung der genannten DNA-Sequenz.

Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind geeignet
25 als Hybridisierungs-Sonden für RNA, cDNA und DNA, um cDNA in voller Länge zu isolieren, die für Pyruvat-Oxidase codieren und solche cDNA oder Gene zu isolieren, die eine hohe Ähnlichkeit der Sequenz mit der des Pyruvat-Oxidase Gens aufweisen.

30 Polynukleotidsequenzen gemäß der Erfindung sind weiterhin als Primer geeignet, mit deren Hilfe mit der Polymerase

Kettenreaktion (PCR) DNA von Genen hergestellt werden kann, die für Pyruvat-Oxidase codieren.

Solche als Sonden oder Primer dienende Oligonukleotide enthalten mindestens 30, bevorzugt mindestens 20, ganz 5 besonders bevorzugt mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide. Geeignet sind ebenfalls Oligonukleotide mit einer Länge von mindestens 40 oder 50 Basen.

„Isoliert“ bedeutet aus seinem natürlichen Umfeld herausgetrennt.

10 „Polynukleotid“ bezieht sich im allgemeinen auf Polyribonukleotide und Polydeoxyribonukleotide, wobei es sich um nicht modifizierte RNA oder DNA oder modifizierte RNA oder DNA handeln kann.

15 Unter „Polypeptiden“ versteht man Peptide oder Proteine, die zwei oder mehr über Peptidbindungen verbundene Aminosäuren enthalten.

Die Polypeptide gemäß Erfindung schließen das Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, insbesondere solche mit der biologischen Aktivität der Pyruvat-Oxidase und auch solche 20 ein, die zu wenigstens 70% identisch sind mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2, bevorzugt zu wenigstens 80% und besonders zu wenigstens 90 % bis 95 % Identität mit dem Polypeptid gemäß SEQ ID No. 2 und die genannte Aktivität aufweisen.

25 Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäuren, insbesondere Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die insbesondere bereits die Aminosäuren, insbesondere L-Lysin produzieren und in denen die für das poxB-Gen codierenden 30 Nukleotidsequenzen abgeschwächt, insbesondere auf niedrigem Niveau exprimiert werden.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die

5 entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese

10 Maßnahmen kombiniert.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren, insbesondere Lysin aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen.

15 Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung *Corynebacterium* handeln. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

20

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind besonders die bekannten Wildtypstämme

25 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032
 Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
 Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
 Corynebacterium melassecola ATCC17965
 Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
 Brevibacterium flavum ATCC14067
30 *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 und
 Brevibacterium divaricatum ATCC14020
und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme,

wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme
Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
5 Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
Corynebacterium glutamicum DSM 5714 Den Erfindern
gelang es, das neue, für das Enzym Pyruvat-Oxidase (EC
1.2.2.2) kodierende *poxB*-Gen von *C. glutamicum* zu
10 isolieren.

Zur Isolierung des *poxB*-Gens oder auch anderer Gene von *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und 15 Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine sehr bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die 20 mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Börmann et al. (Molecular Microbiology 6(3), 317-326, 1992) 25 wiederum beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032 unter Verwendung des Cosmids pHC79 (Hohn und Collins, Gene 11, 291-298 (1980)). O'Donohue (The Cloning and Molecular Analysis of Four Common Aromatic Amino Acid Biosynthetic Genes from *Corynebacterium glutamicum*. Ph.D. Thesis, National University of Ireland, Galway, 1997) 30 beschreibt die Klonierung von *C. glutamicum* Genen unter

Verwendung des von Short et al. (Nucleic Acids Research, 16: 7583) beschriebenen λ Zap Expressionssystems.

Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 5 25, 807-818 (1979)) oder pUC9 (Vieira et al., 1982, Gene, 19:259-268) verwendet werden. Als Wirs eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind wie beispielsweise der Stamm DH5 α (Jeffrey H. Miller: „A Short Course in Bacterial 10 Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria“, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1992).

Die mit Hilfe von Cosmiden oder anderen λ -Vektoren klonierten langen DNA-Fragmente können anschließend 15 wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert werden.

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 20 1977) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen wie z. B. dem von Staden (Nucleic Acids Research 14, 217-232(1986)), dem GCG-Programm von Butler (Methods of Biochemical Analysis 25 39, 74-97 (1998)) dem FASTA-Algorithmus von Pearson und Lipman (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85, 2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich zugänglichen 30 Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des

National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Auf diese Weise wurde die neue für das poxB-Gen kodierende DNA-Sequenz von C. glutamicum erhalten, die als SEQ ID No.

5 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurde aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenz des entsprechenden Proteins abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des poxB-Genproduktes
10 dargestellt.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 1 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID

15 No. 1 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. Schließlich sind DNA-Sequenzen Bestandteil der Erfindung, die durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von Primern hergestellt werden, die sich aus SEQ ID No. 1 ergeben.

20 Anleitungen zur Identifizierung von DNA-Sequenzen mittels Hybridisierung findet der Fachmann unter anderem im Handbuch "The DIG System Users Guide for Filter Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) und bei Liebl et al.

25 (International Journal of Systematic Bacteriology (1991) 41: 255-260). Anleitungen zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) findet der Fachmann unter anderem im Handbuch von Gait: Oligonukleotide synthesis: a practical approach (IRL Press, Oxford, UK, 1984) und bei Newton und Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 1994).

Die Erfinder fanden heraus, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des poxB-Gens in verbesserter Weise L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin produzieren.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des *poxB*-Gens oder die katalytischen Eigenschaften des Enzymproteins herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen 5 kombiniert werden.

Die Erniedrigung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression erfolgen.

Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise

10 Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z. B. in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und 15 Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Patek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers 20 („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der 25 katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 30 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydrolase aus *Corynebacterium glutamicum*: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jülich-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen 35 können bekannten Lehrbüchern der Genetik und

Molekularbiologie wie z. B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen,

- 5 Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen (missense mutations) oder Nichtsinnmutationen (nonsense mutations) gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens 10 einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen (frame shift mutations) in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen 15 Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z. B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, 20 Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Ein Beispiel für ein Plasmid, mit Hilfe dessen eine

- 25 Insertionsmutagenese des poxB-Gens durchgeführt werden kann, ist pCR2.1poxBint (Figur 1).

Plasmid pCR2.1poxBint besteht aus dem von Mead et al.

(Bio/Technology 9:657-663 (1991)) beschriebenen Plasmid pCR2.1-TOPO, in das ein internes Fragment des poxB-Gens,

- 30 dargestellt in SEQ-ID No. 3, eingebaut wurde. Dieses Plasmid führt nach Transformation und homologer Rekombination in das chromosomal poxB-Gen (Insertion) zu einem Totalverlust der Enzymfunktion. Auf diese Weise wurde beispielhaft der Stamm DSM5715::pCR2.1poxBint hergestellt, 35 dessen Pyruvat-Oxidase ausgeschaltet ist. Weitere

Anleitungen und Erläuterungen zur Insertionsmutagenese findet man beispielsweise bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) oder Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580
5 (1994)).

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des *poxB*-Gens eines oder mehrere Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der
10 Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus oder des Aminosäure-Exports zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren.

So kann beispielsweise für die Herstellung von L-Lysin

- gleichzeitig das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende *dapA*-Gen (EP-B 0 197 335), oder
- 15 • gleichzeitig das für die Tetrahydrodipicolinat Succinylase kodierende *dapD* Gen (Wehrmann et al., Journal of Bacteriology 180, 3159-3165 (1998)), oder
- gleichzeitig das Gen für die Succinyldiaminopimelate-Desuccinylase kodierende *dapE* Gen (Wehrmann et al.,
20 Journal of Bacteriology 177: 5991-5993 (1995)), oder
- gleichzeitig das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende *gap*-Gen (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase codierende pyc-Gen(Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086), oder
- 25 • gleichzeitig das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende *mqo*-Gen (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 254, 395 - 403 (1998)), oder

- gleichzeitig das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen
(DE-A-195 48 222)

überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren,
5 insbesondere L-Lysin vorteilhaft sein, neben der
Abschwächung des poxB-Gens unerwünschte Nebenreaktionen
auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing
Micro-organisms“, in: Overproduction of Microbial Products,
Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London,
10 UK, 1982).

Die das Polynukleotid gemäß Anspruch 1 enthaltenden
Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und
können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch -
Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch
15 (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren
(repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von
L-Aminosäuren insbesondere L-Lysin kultiviert werden. Eine
Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im
Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die
20 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart,
1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und
periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag,
Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den
25 Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen
von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im
Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“ der
American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA,
1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und
30 Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose,
Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und
Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und
Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure
und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und

organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoffhaltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt,

5 Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung

10 verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das

15 Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines

20 einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure

25 oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika

30 hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die

35 Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird

normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann so wie bei
5 Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei
Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174)
10 beschrieben.

Folgender Mikroorganismus wurde bei der Deutschen Sammlung für Mikrorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapester Vertrag hinterlegt:

- Escherichia coli Stamm DH5 α /pCR2.1poxBint als DSM 13114.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

- 5 Herstellung einer genomischen Cosmid-Genbank aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

Chromosomal DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al., (1995, Plasmid 33:168-179) beschrieben, isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI

10 (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Code no. 1758250)

15 dephosphoryliert. Die DNA des Cosmid-Vektors SuperCos1 (Wahl et al. (1987) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 84:2160-2164), bezogen von der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Produktbeschreibung SuperCos1 Cosmid Vektor Kit, Code no. 251301) wurde mit dem

20 Restriktionsenzym XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-02) gespalten und ebenfalls mit shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurde die Cosmid-DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg,

25 Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-04) gespalten. Die auf diese Weise behandelte Cosmid-DNA wurde mit der behandelten ATCC13032-DNA gemischt und der Ansatz mit T4-DNA-Ligase (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung T4-DNA-Ligase, Code no. 27-

30 0870-04) behandelt. Das Ligationsgemisch wurde anschließend mit Hilfe des Gigapack II XL Packing Extracts (Stratagene, La Jolla, USA, Produktbeschreibung Gigapack II XL Packing Extract, Code no. 200217) in Phagen verpackt. Zur Infektion des *E. coli* Stammes NM554 (Raleigh et al. 1988, Nucleic

Acid Res. 16:1563-1575) wurden die Zellen in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und mit einem Aliquot der Phagensuspension vermischt. Infektion und Titerung der Cosmidbank wurden wie bei Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei die Zellen auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert wurden. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden rekombinante Einzelklone selektioniert.

10

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung des poxB-Gens

Die Cosmid-DNA einer Einzelkolonie wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Product No. 27106, Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben isoliert und mit dem Restriktionsenzym Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung Sau3AI, Product No. 27-0913-02) partiell gespalten. Die DNA-Fragmente wurden mit shrimp alkalischer Phosphatase (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland, Produktbeschreibung SAP, Product No. 1758250) dephosphoryliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Isolierung der Cosmidfragmente im Größenbereich von 1500 bis 2000 bp mit dem QiaExII Gel Extraction Kit (Product No. 20021, Qiagen, Hilden, Germany). Die DNA des Sequenziervektors pZero-1 bezogen von der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande, Produktbeschreibung Zero Background Cloning Kit, Product No. K2500-01) wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland, Produktbeschreibung BamHI, Product No. 27-0868-04) gespalten. Die Ligation der Cosmidfragmente in den Sequenziervektor pZero-1 wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit

T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch würde anschließend in den E. coli Stamm DH5 α MCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch et al. 1994, FEMS Microbiol Letters, 123:343-7) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) mit 50 µg/ml Zeocin ausplattiert. Die Plasmidpräparation der rekombinanten Klone erfolgte mit dem Biorobot 9600 (Product No. 900200, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Sequenzierung erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977, Proceedings of the National Academies of Sciences U.S.A., 74:5463-5467) mit Modifikationen nach Zimmermann et al. (1990, Nucleic Acids Research, 18:1067). Es wurde der "RR dRhodamin Terminator Cycle Sequencing Kit" von PE Applied Biosystems (Product No. 403044, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung und Analyse der Sequenzierreaktion erfolgte in einem "Rotiphorese NF Acrylamid/Bisacrylamid" Gel (29:1) (Product No. A124.1, Roth, Karlsruhe, Germany) mit dem "ABI Prism 377" Sequenziergerät von PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland).

Die erhaltenen Roh-Sequenzdaten wurden anschließend unter Anwendung des Staden-Programmpakets (1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) Version 97-0 prozessiert. Die Einzelsequenzen der pZero1-Derivate wurden zu einem zusammenhängenden Contig assembled. Die computergestützte Kodierbereichsanalyse wurden mit dem Programm XNIP (Staden, 1986, Nucleic Acids Research, 14:217-231) angefertigt. Weitere Analysen wurden mit den "BLAST search programs" (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research, 25:3389-3402), gegen die non-redundant Datenbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI, Bethesda, MD, USA) durchgeführt.

Die erhaltene Nukleotidsequenz ist in SEQ ID No. 1 dargestellt. Die Analyse der Nukleotidsequenz ergab ein offenes Leseraster von 1737 Basenpaaren, welches als poxB-Gen bezeichnet wurde. Das poxB-Gen kodiert für ein
5 Polypeptid von 579 Aminosäuren.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsvektors für die Integrationsmutagenese des poxB-Gens

10 Aus dem Stamm ATCC 13032 wurde nach der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) chromosomal DNA isoliert. Aufgrund der aus Beispiel 2 für C. glutamicum bekannten Sequenz des poxB-Gens wurden die folgenden Oligonukleotide für die Polymerase Kettenreaktion
15 ausgewählt:

poxBint1:

5` TGC GAG ATG GTG AAT GGT GG 3`

poxBint2:

5` GCA TGA GGC AAC GCA TTA GC 3`

20 Die dargestellten Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und nach der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) mit Pwo-Polymerase der Firma Boehringer die PCR Reaktion
25 durchgeführt. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion wurde ein ca. 0,9 kb großen DNA-Fragment isoliert, welches ein internes Fragment des poxB-Gens trägt und in der SEQ ID No. 3 dargestellt ist.

Das amplifizierte DNA Fragment wurde mit dem TOPO TA
30 Cloning Kit der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA; Katalog Nummer K4500-01) in den Vektor pCR2.1-TOPO (Mead et al. (1991) Bio/Technology 9:657-663) ligiert.

- Anschließend wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mit dem Ligationsansatz (Hanahan, In: DNA cloning. A practical approach. Vol.I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985) elektroporiert. Die Selektion von Plasmid-tragenden
- 5 Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Transformationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), der mit 25 mg/l Kanamycin supplementiert worden war.
- 10 Plasmid-DNA wurde aus einer Transformante mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen isoliert und durch Restriktion mit dem Restriktionsenzym EcoRI und anschließender Agarosegel-Elektrophorese (0,8%) überprüft. Das Plasmid wurde pCR2.1poxBint genannt.

15

Beispiel 4

Integrationsmutagenese des poxB-Gens in dem Lysinproduzenten DSM 5715

- Der in Beispiel 2 genannte Vektor pCR2.1poxBint wurde nach
20 der Elektroporationsmethode von Tauch et.al. (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) in Corynebacterium glutamicum DSM 5715 elektroporiert. Bei dem Stamm DSM 5715 handelt es sich um einen AEC resistenten Lysin-Produzenten. Der Vektor pCR2.1poxBint kann in DSM5715
25 nicht selbständig replizieren und bleibt nur dann in der Zelle erhalten, wenn er ins Chromosom von DSM 5715 integriert hat. Die Selektion von Klonen mit ins Chromosom integriertem pCR2.1poxBint erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), der mit
30 15 mg/l Kanamycin supplementiert worden war. Für den Nachweis der Integration wurde das poxBint Fragment nach der Methode "The DIG System Users Guide for Filter

Hybridization" der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland, 1993) mit dem Dig-Hybridisierungskit der Firma Boehringer markiert.

Chromosomal DNA eines potentiellen Integranten wurde nach 5 der Methode von Eikmanns et al. (Microbiology 140: 1817 - 1828 (1994)) isoliert und jeweils mit den Restriktionsenzymen SalI, SacI und HinDIII geschnitten. Die entstehenden Fragmente wurden mit Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem Dig-Hybrisierungskit der Firma 10 Boehringer bei 68°C hybridisiert. Das in Beispiel 3 genannte Plasmid pCR2.1poxBint hatte innerhalb des chromosomalen poxB-Gens ins Chromosom von DSM5715 inseriert. Der Stamm wurde als DSM5715::pCR2.1poxBint bezeichnet.

15

Beispiel 5

Herstellung von Lysin

Der in Beispiel 3 erhaltene C. glutamicum Stamm DSM5715::pCR2.1poxBint wurde in einem zur Produktion von 20 Lysin geeigneten Nährmedium kultiviert und der Lysingehalt im Kulturüberstand bestimmt.

Dazu wurde der Stamm zunächst auf Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hirn-Herz Agar mit Kanamycin (25 mg/l) für 24 Stunden bei 33°C inkubiert. Ausgehend von 25 dieser Agarplattenkultur wurde eine Vorkultur angeimpft (10 ml Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben). Als Medium für die Vorkultur wurde das Vollmedium CgIII verwendet. Diesem wurde Kanamycin (25 mg/l) zugesetzt. Die Vorkultur wurde 48 Stunden bei 33°C bei 240 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

30 Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur angeimpft, so daß die Anfangs-OD (660nm) der Hauptkultur 0,1 OD betrug. Für die Hauptkultur wurde das Medium MM verwendet.

Medium MM

CSL (Corn Steep Liquor) 5 g/l

MOPS 20 g/l

Glucose (getrennt autoklaviert) 50g/l

Salze:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25 g/l

KH_2PO_4 0,1 g/l

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 1,0 g/l

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mg/l

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 10 mg/l

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5,0mg/l

Biotin (sterilfiltriert) 0,3 mg/l

Thiamin * HCl (sterilfiltriert) 0,2 mg/l

Leucin (sterilfiltriert) 0,1 g/l

CaCO_3 25 g/l

CSL, MOPS und die Salzlösung werden mit Ammoniakwasser auf pH 7 eingestellt und autoklaviert. Anschließend werden die

5 sterilen Substrat- und Vitaminlösungen zugesetzt, sowie das trocken autoklavierte CaCO_3 zugesetzt.

Die Kultivierung erfolgt in 10 ml Volumen in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Es wurde Kanamycin (25

mg/l) zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 33°C und 80%

10 Luftfeuchte.

Nach 48 Stunden wurde die OD bei einer Meßwellenlänge von 660 nm mit dem Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, München) ermittelt. Die gebildete Lysinmenge wurde mit einem Aminosäureanalysator der Firma Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Deutschland) durch Ionenaustauschchromatographie und Nachsäulenderivatisierung mit Ninhydrindetektion bestimmt.

In Tabelle 1 ist das Ergebnis des Versuchs dargestellt.

Tabelle 1

Stamm	OD(660)	Lysin-HCl g/l
DSM5715	13,1	9,5
DSM5715::pCR2.1poxBint	12,5	12,9

Folgende Figuren sind beigelegt:

Figur 1: Karte des Plasmids pCR2.1poxBint.

Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung.

5

ColE1 ori:	Replikationsursprung des Plasmids ColE1
lacZ:	5' Ende des β -Galactosidase Gens
f1 ori:	Replikationsursprung des Phagen f1
KmR:	Kanamycin Resistenz
ApR:	Ampicillin Resistenz
BamHI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms BamHI
EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
poxBint:	internes Fragment des poxB-Gens

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue für das poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen

<130> 990159 BT

<140>

10 <141>

<160> 3

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2160

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (327)..(2063)

25

<220>

<221> -35_signal

<222> (227)..(232)

<220>

30

<221> -10_signal

<222> (256)..(261)

<400> 1

35 ttagaggcga ttctgtgagg tcacttttg tggggtcggg gtctaaattt ggccagttt 60

cgaggcgacc agacaggcgt gcccacgatg tttaatagg cgatcggtgg gcatctgtgt 120

ttggtttcga cgggctgaaa ccaaaccaga ctgcccagca acgacggaaa tcccaaaagt 180

40

gggcattccct gtttgttacc gagtacccac ccgggcctga aactccctgg caggcggcgc 240

aagcgtggca acaactggaa tttaagagca caattgaagt cgcaccaagt taggcaacac 300

aatagccata acgttgagga gttcag atg gca cac agc tac gca gaa caa tta 353

Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu

1

5

50 att gac act ttg gaa gct caa ggt gtg aag cga att tat ggt ttg gtg 401

Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val

5

10 15 20 25

55 ggt gac agc ctt aat ccg atc gtg gat gct gtc cgc caa tca gat att 449

Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile

30

35

40

gag tgg gtg cac gtt cga aat gag gaa gct gcg gct ttt gca gcc ggt 497

Glu Trp Val His Val Arg Asn Glu Glu Ala Ala Phe Ala Ala Gly

45

50

55

	gct gaa tcg ttg atc act ggg gag ctg gca gta tgt gct gct tct tgt	545
	Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys	
	60 65 70	
5	ggt cct gga aac aca cac ctg att cag ggt ctt tat gat tcg cat cga	593
	Gly Pro Gly Asn Thr His Leu Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg	
	75 80 85	
10	aat ggt gcg aag gtg ttg gcc atc gct agc cat att ccg agt gcc cag	641
	Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln	
	90 95 100 105	
15	att ggt tcg acg ttc ttc cag gaa acg cat ccg gag att ttg ttt aag	689
	Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys	
	110 115 120	
	gaa tgc tct ggt tac tgc gag atg gtg aat ggt ggt gag cag ggt gaa	737
	Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu Met Val Asn Gly Glu Gln Gly Glu	
	125 130 135	
20	cgc att ttg cat cac gcg att cag tcc acc atg gct ggt aaa ggt gtg	785
	Arg Ile Leu His His Ala Ile Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val	
	140 145 150	
25	tcg gtg gta gtg att cct ggt gat atc gct aag gaa gac gca ggt gac	833
	Ser Val Val Val Ile Pro Gly Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp	
	155 160 165	
30	ggt act tat tcc aat tcc act att tct tct ggc act cct gtg gtg ttc	881
	Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe	
	170 175 180 185	
35	ccg gat cct act gag gct gca gcg ctg gtg gag gcg att aac aac gct	929
	Pro Asp Pro Thr Glu Ala Ala Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala	
	190 195 200	
	aag tct gtc act ttg ttc tgc ggt gcg ggc gtg aag aat gct cgc gcg	977
	Lys Ser Val Thr Leu Phe Cys Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala	
	205 210 215	
40	cag gtg ttg gag ttg gcg gag aag att aaa tca ccg atc ggg cat gcg	1025
	Gln Val Leu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala	
	220 225 230	
45	ctg ggt aag cag tac atc cag cat gag aat ccg ttt gag gtc ggc	1073
	Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ile Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly	
	235 240 245	
50	atg tct ggc ctg ctt ggt tac ggc gcc tgc gtg gat gct tcc aat gag	1121
	Met Ser Gly Leu Leu Gly Tyr Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu	
	250 255 260 265	
	gct gat ctg ctg att cta ttg ggt acg gat ttc cct tat tct gat ttc	1169
	Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe	
	270 275 280	
55	ctt cct aaa gac aac gtt gcc cag gtg gat atc aac ggt gct cac att	1217
	Leu Pro Lys Asp Asn Val Ala Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile	
	285 290 295	

	ggt cga cgt acc acg gtg aag tat ccg gtg acc ggt gat gtt gct gca	1265
	Gly Arg Arg Thr Thr Val Lys Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala	
	300 305 310	
5	aca atc gaa aat att ttg cct cat gtg aag gaa aaa aca gat cgt tcc	1313
	Thr Ile Glu Asn Ile Leu Pro His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser	
	315 320 325	
10	ttc ctt gat cgg atg ctc aag gca cac gag cgt aag ttg agc tcg gtg	1361
	Phe Leu Asp Arg Met Leu Lys Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val	
	330 335 340 345	
15	gta gag acg tac aca cat aac gtc gag aag cat gtg cct att cac cct	1409
	Val Glu Thr Tyr Thr His Asn Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro	
	350 355 360	
20	gaa tac gtt gcc tct att ttg aac gag ctg gcg gat aag gat gcg gtg	1457
	Glu Tyr Val Ala Ser Ile Leu Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val	
	365 370 375	
	ttt act gtg gat acc ggc atg tgc aat gtg tgg cat gcg agg tac atc	1505
	Phe Thr Val Asp Thr Gly Met Cys Asn Val Trp His Ala Arg Tyr Ile	
	380 385 390	
25	gag aat ccg gag gga acg cgc gac ttt gtg ggt tca ttc cgc cac ggc	1553
	Glu Asn Pro Glu Gly Thr Arg Asp Phe Val Gly Ser Phe Arg His Gly	
	395 400 405	
30	acg atg gct aat gcg ttg cct cat gcg att ggt gcg caa agt gtt gat	1601
	Thr Met Ala Asn Ala Leu Pro His Ala Ile Gly Ala Gln Ser Val Asp	
	410 415 420 425	
35	cga aac cgc cag gtg atc gcg atg tgt ggc gat ggt ggt ttg ggc atg	1649
	Arg Asn Arg Gln Val Ile Ala Met Cys Gly Asp Gly Gly Leu Gly Met	
	430 435 440	
40	ctg ctg ggt gag ctt ctg acc gtt aag ctg cac caa ctt ccg ctg aag	1697
	Leu Leu Gly Glu Leu Leu Thr Val Lys Leu His Gln Leu Pro Leu Lys	
	445 450 455	
	gct gtg gtg ttt aac aac agt tct ttg ggc atg gtg aag ttg gag atg	1745
	Ala Val Val Phe Asn Asn Ser Ser Leu Gly Met Val Lys Leu Glu Met	
	460 465 470	
45	ctc gtg gag gga cag cca gaa ttt ggt act gac cat gag gaa gtg aat	1793
	Leu Val Glu Gly Gln Pro Glu Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn	
	475 480 485	
50	ttc gca gag att gcg gcg gct gcg ggt atc aaa tcg gta cgc atc acc	1841
	Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr	
	490 495 500 505	
55	gat ccg aag aaa gtt cgc gag cag cta gct gag gca ttg gca tat cct	1889
	Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro	
	510 515 520	

	gga cct gta ctg atc gat atc gtc acg gat cct aat gcg ctg tcg atc Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile 525 530 535 *	1937
5	cca cca acc atc acg tgg gaa cag gtc atg gga ttc agc aag gcg gcc Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala 540 545 550	1985
10	acc cga acc gtc ttt ggt gga gga gta gga gcg atg atc gat ctg gcc Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala 555 560 565	2033
15	cgt tcg aac ata agg aat att cct act cca tgatgattga tacacctgct Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile Pro Thr Pro 570 575	2083
	gttctcattg accgcgagcg cttaactgcc aacatttcca gcatggcagc tcacccgggt 2143	
20	ccccatgaga ttgcct 2160	
	<210> 2	
25	<211> 579	
	<212> PRT	
	<213> Corynebacterium glutamicum	
	<400> 2	
30	Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln 1 5 10 15	
	Gly Val Lys Arg Ile Tyr Gly Leu Val Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile 20 25 30	
35	Val Asp Ala Val Arg Gln Ser Asp Ile Glu Trp Val His Val Arg Asn 35 40 45	
	Glu Glu Ala Ala Ala Phe Ala Ala Gly Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly 50 55 60	
40	Glu Leu Ala Val Cys Ala Ala Ser Cys Gly Pro Gly Asn Thr His Leu 65 70 75 80	
	Ile Gln Gly Leu Tyr Asp Ser His Arg Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala 85 90 95	
45	Ile Ala Ser His Ile Pro Ser Ala Gln Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln 100 105 110	
50	Glu Thr His Pro Glu Ile Leu Phe Lys Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu 115 120 125	
	Met Val Asn Gly Gly Glu Gln Gly Glu Arg Ile Leu His His Ala Ile 130 135 140	
55	Gln Ser Thr Met Ala Gly Lys Gly Val Ser Val Val Val Ile Pro Gly 145 150 155 160	

Asp Ile Ala Lys Glu Asp Ala Gly Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr
 165 170 175
 Ile Ser Ser Gly Thr Pro Val Val Phe Pro Asp Pro Thr Glu Ala Ala
 5 180 185 190
 Ala Leu Val Glu Ala Ile Asn Asn Ala Lys Ser Val Thr Leu Phe Cys
 195 200 205
 10 Gly Ala Gly Val Lys Asn Ala Arg Ala Gln Val Leu Glu Leu Ala Glu
 210 215 220
 Lys Ile Lys Ser Pro Ile Gly His Ala Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ile
 225 230 235 240
 15 Gln His Glu Asn Pro Phe Glu Val Gly Met Ser Gly Leu Leu Gly Tyr
 245 250 255
 Gly Ala Cys Val Asp Ala Ser Asn Glu Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu
 20 260 265 270
 Gly Thr Asp Phe Pro Tyr Ser Asp Phe Leu Pro Lys Asp Asn Val Ala
 275 280 285
 25 Gln Val Asp Ile Asn Gly Ala His Ile Gly Arg Arg Thr Thr Val Lys
 290 295 300
 Tyr Pro Val Thr Gly Asp Val Ala Ala Thr Ile Glu Asn Ile Leu Pro
 305 310 315 320
 His Val Lys Glu Lys Thr Asp Arg Ser Phe Leu Asp Arg Met Leu Lys
 325 330 335
 Ala His Glu Arg Lys Leu Ser Ser Val Val Glu Thr Tyr Thr His Asn
 35 340 345 350
 Val Glu Lys His Val Pro Ile His Pro Glu Tyr Val Ala Ser Ile Leu
 355 360 365
 40 Asn Glu Leu Ala Asp Lys Asp Ala Val Phe Thr Val Asp Thr Gly Met
 370 375 380
 Cys Asn Val Trp His Ala Arg Tyr Ile Glu Asn Pro Glu Gly Thr Arg
 385 390 395 400
 45 Asp Phe Val Gly Ser Phe Arg His Gly Thr Met Ala Asn Ala Leu Pro
 405 410 415
 His Ala Ile Gly Ala Gln Ser Val Asp Arg Asn Arg Gln Val Ile Ala
 50 420 425 430
 Met Cys Gly Asp Gly Gly Leu Gly Met Leu Leu Gly Glu Leu Leu Thr
 435 440 445
 55 Val Lys Leu His Gln Leu Pro Leu Lys Ala Val Val Phe Asn Asn Ser
 450 455 460
 Ser Leu Gly Met Val Lys Leu Glu Met Leu Val Glu Gly Gln Pro Glu
 465 470 475 480

Phe Gly Thr Asp His Glu Glu Val Asn Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala
 485 490 495

5 Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu
 500 505 510

Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile
 515 520 525

10 Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu
 530 535 540

Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly
 15 545 550 555 560

Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile
 565 570 575

20 Pro Thr Pro

25 <210> 3
 <211> 875
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

30 <400> 3
 tgcgagatgg tgaatggtgg tgaggcagggt gaacgcattt tgcacacgc gattcagtcc 60
 accatggcgg gtaaagggtgt gtcggtggtt gtgatccctg gtgatatcgc taaggaagac 120
 gcaggtgacg gtacttattc caattccact atttcttctg gcactcctgt ggtgttcccg 180
 gatcctactg aggctgcagc gctggtggag gcgattaaca acgctaagtc tgtcactttg 240
 ttctgcggtg cgggcgtgaa gaatgctcgc gcgcagggtgt tggagttggc ggagaagatt 300
 aaatcaccga tcgggcattgc gctgggtggt aagcagtaca tccagcatga gaatccgtt 360
 gaggtcggca tgtctggcct gcttggttac ggcgcctgctg tggatgcgtc caatgaggcg 420
 gatctgctga ttctattttgg tacggatttc ccttattctg atttccttcc taaagacaac 480
 gttgcccaagg tggatatcaa cggtgcgcac attggtcgac gtaccacqgt gaagtatccg 540
 40 gtcgacccggtg atgttgcgtc aacaatcgaa aatatttgc ctcatgtgaa ggaaaaaaca 600
 gatcggttcct tccttgatcg gatgctcaag gcacacgagc gtaagttgag ctcggtggt 660
 gagacgtaca cacataacgt cgagaagcat gtgccttattc accctgaata cgttgcctct 720
 attttgaacg agctggcgga taaggatgcg gtgttactg tggataccgg catgtgcaat 780
 45 gtgtggcatg cgaggtacat cgagaatccg gaggaaacgc gcgactttgt gggttcattc 840
 cgccacggca cgatggctaa tgcgttgcct catgc 875

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das zu mindestens 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
 - b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
 - c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c).
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine replizierbare, bevorzugt rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 2, die für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 2 darstellt, enthält.

6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2,
enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ-ID-No. 1,
oder
 - 5 (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i)
innerhalb des Bereichs der Degeneration des
genetischen Codes einspricht, oder
 - 10 (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur
Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz
hybridisiert, und gegebenenfalls
 - (iv) funktionsneutrale Sinnmutanten in (i)
7. Vektor, enthaltend das Polynukleotid gemäß Anspruch 1,
insbesondere Punkt d, hinterlegt in E.coli, DSM 13114.
8. Als Wirtszelle dienende coryneforme Bakterien, die
15 eine Deletion oder eine Insertion in dem poxB-Gen
enthalten.
9. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren,
insbesondere L-Lysin,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
20 daß man folgende Schritte durchführt,
 - a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden Bakterien, in denen man zumindest
das poxB-Gen abschwächt,
 - b) Anreicherung des gewünschten L-Aminosäure im
Medium
oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolieren der L-Aminosäure.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
30 daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich

weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9,
durch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9,
durch gekennzeichnet,
daß man die Expression des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, insbesondere 1 a bis 1 c verringert.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9,
durch gekennzeichnet,
daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymproteins) herabsetzt, für das das Polynukleotid gemäß Anspruch 1, insbesondere 1 a bis 1 c codiert.
14. Verfahren gemäß Anspruch 9,
durch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zur Abschwächung die Integrationsmutagenese mittels des Plasmids pCR2.1poxBint, dargestellt in Figur 1 und hinterlegt als DSM 13114, oder eines seiner Bestandteile verwendet.
15. Verfahren gemäß Anspruch 9,
durch gekennzeichnet,
daß man für die Herstellung von L-Lysin Bakterien fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere Gene überexprimiert, ausgewählt aus der Gruppe
 - das für die Dihydripicolinat-Synthase kodierende dapA-Gen,

- das die S-(2-Aminoethyl)-Cystein-Resistenz vermittelnde DNA-Fragment,
- das die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen,
- das Gen für die Succinyldiaminopimelate-
5 Desuccinylase kodierende dapE Gen
- das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende dap-Gen
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen
- das für den Lysin-Export kodierende lysE-Gen.

10 16. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium
15 glutamicum einsetzt.

Neue für das poxB-Gen codierende Nukleotidsequenzen**Zusammenfassung**

Isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70 % identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid codiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70 % identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Basen der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

und Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren durch Abschwächung des poxB-Gens.

Figur 1: Plasmidkarte pCR2.1poxBint

